

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2000-505281
(P2000-505281A)

(43)公表日 平成12年5月9日(2000.5.9)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 12 Q 1/68		C 12 Q 1/68	A
G 01 N 21/64		G 01 N 21/64	F
33/543	5 9 5	33/543	5 9 5
// C 12 N 15/09		C 12 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁)

(21)出願番号 特願平9-526983
 (86) (22)出願日 平成9年1月24日(1997.1.24)
 (85)翻訳文提出日 平成10年7月27日(1998.7.27)
 (86)国際出願番号 PCT/US97/01052
 (87)国際公開番号 WO97/27326
 (87)国際公開日 平成9年7月31日(1997.7.31)
 (31)優先権主張番号 08/592,779
 (32)優先日 平成8年1月26日(1996.1.26)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP

(71)出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94612,
 オークランド, レイクサイド ドライブ
 300, トゥエンティセカンド フロア
 (71)出願人 メディカル リサーチ カウンシル
 イギリス国, ロンドン ダブリュ1エヌ
 4エーエル, パーク クレセント 20
 (72)発明者 ピンケル, ダニエル
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94595,
 ウォルナット クリーク, マンザナイト
 コート 31
 (74)代理人 弁理士 石田 敏 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】光ファイバーバイオセンサ用高密度アレイの製造法と読出法

(57)【要約】

本発明は、各ファイバーが、その“センサ末端”に、生物学的“結合パートナー”(他の分子に特異的に結合して、例えば、抗体-抗原、レクチナー-炭水化物、核酸-核酸、ビオチン-アビシンなどの結合複合体を形成する分子)を結合されている複数の光ファイバーを含んでなるバイオセンサの製造と使用に関する。本発明のバイオセンサは、2種以上の異なる種の生物学的結合パートナーをもっていることが好ましい。本発明のセンサは、複数群の光ファイバーを提供することによって製造される。各群は、パッチとして処理して、ファイバー束を構成するファイバーのセンサ末端に異なる種の生物学的結合パートナーを結合させる。ファイバー束中の各ファイバーまたはファイバー群は、後に、異なるファイバーのアレイに組み合わされたときに、別個にアドレス指定できるように、特別に確認することができる。次にファイバーまたはファイバー群は、選択されて、異なるファイバー束から別個に分離される。その別個に分離されたファイバーは次にそのセンサ末端で組み合わされて、ファイバーの高密度センサアレイが製造され、そのアレイ

は、試験試料の成分が、センサアレイの異なるファイバー上の各種結合パートナーに結合するのを同時に検定することができる。次に、光ファイバーの伝送末端は、多数の光センサのような検出器に別個にアドレス指定される。結合パートナーをその基質に結合させて結合複合体を形成させることによって生成する光信号を、光ファイバーまたはファイバー群によって、各々別個の試験のため検出器に導く。ファイバーまたはファイバー群のアドレス指定された伝送末端を検査することによって、そのアドレス指定された伝送末端は、センサによる迅速な試料確認を助ける独特のパターンを伝送することができる。

【特許請求の範囲】

1. マトリックス重合体を用いて固体表面に生物学的結合パートナーを結合させる方法であって；下記ステップ、すなわち

核酸とマトリックス重合体を含んでなるマトリックス溶液を調製し；

上記マトリックス溶液を固体表面と接触させて、生物学的結合パートナーを結合させて、前記生物学的結合パートナーが第二分子を特異的に認識して第二分子を捕捉できるようにする；

ステップを含んでなる方法。

2. 請求の範囲1記載の、マトリックス重合体を用いて固体表面に生物学的結合パートナーを結合させる方法であって；

マトリックス溶液を製造するステップが、生物学的結合パートナーを含んでなる水溶液を、マトリックス重合体を含んでなる第二溶液と接触させることからなる方法。

3. 請求の範囲1記載の、マトリックス重合体を用いて固体表面に生物学的結合パートナーを結合させる方法であって；

生物学的結合パートナーが核酸であり、その結合パートナーを固体表面に結合させて、その核酸が相補的核酸と特異的にハイブリッドを形成することができるようになる方法。

4. 請求の範囲1記載の、マトリックス重合体を用いて固体表面に生物学的結合パートナーを結合させる方法であって；

固体表面がスライドガラスである方法。

5. 請求の範囲1記載の、マトリックス重合体を用いて固体表面に生物学的結合パートナーを結合させる方法であって；

固体表面が光ファイバーのセンサ末端である方法。

6. 請求の範囲1記載の、マトリックス重合体を用いて固体表面

に生物学的結合パートナーを結合させる方法であって；

マトリックス重合体がニトロセルロースである方法。

7. 請求の範囲1記載の、マトリックス重合体を用いて固体表面に生物学的結

合パートナーを結合させる方法であって；

第二溶液がDMSOに溶解したニトロセルロースを含有している方法。

8. 請求の範囲1記載の、マトリックス重合体を用いて固体表面に生物学的結合パートナーを結合させる方法であって；

さらに、マトリックス溶液を固体表面に接触させた後、そのマトリックス溶液を乾燥させるステップを含んでなる方法。

9. 試料中の複数の生物学的結合パートナーを感知する光ファイバー束を構築する方法であって；下記ステップすなわち、

各ファイバーがセンサ末端と伝送末端を有する複数の光ファイバーを提供し、各ファイバーには、そのセンサ末端に、一つの種の生物学的結合パートナーを結合させ、その結合パートナーはマトリックス重合体を用いて光ファイバーのセンサ末端に結合させて、その生物学的結合パートナーが第二分子を特異的に認識して第二分子を捕捉できるようにし；

異なる結合パートナーを有する前記ファイバーを組み合わせて光ファイバーレイを製造し、前記ファイバーが、試料を同時に検定するためセンサ末端がともに整列しており；そして

組み合わされた別個のファイバーの伝送末端を、問合せに対してアドレス指定して、試料に対する光ファイバーセンサを製造する；

ステップを含んでなる方法。

10. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイバー束を構築する方法であって；

マトリックス重合体がニトロセルロースである方法。

11. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイバー束を構築する方法であって；

生物学的結合パートナーが核酸でありそしてその結合パートナーをセンサ末端に結合させて、核酸が相補的核酸とハイブリッドを形成することができるようする方法。

12. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイ

バー東を構築する方法であって；下記ステップ、すなわち

各ファイバーがセンサ末端と伝送末端を有する複数の光ファイバーを提供し；
複数の光ファイバーを、複数のファイバー群中に入れ、その各ファイバー群は
同時に処理するためセンサ末端をともに整列させ；

各バッチが、光ファイバーの選択された群の光ファイバーとともに整列させた
センサ末端に、処理によって結合させるのに適した単一種の生物学的結合パート
ナーを含有している複数の異なるバッチを提供し；

異なる生物学的結合パートナーを含有する異なるバッチ内に、異なるファイバ
ー群のともに整列させたセンサ末端を入れて処理し、同じ種の生物学的結合パー
トナーを有する各群の光ファイバーのセンサ末端および異なる種の生物学的結合
パートナーを有する異なる群の光ファイバーのセンサ末端を有する複数群の光フ
ァイバーを製造し；次いで

各ファイバー群からファイバーを選択して、各ファイバーがセンサ末端と伝送
末端を有し、そして各ファイバーがそのセンサ末端に一つの種の生物学的結合パー
トナーが結合されている複数の光ファイバーを提供する；

ステップを含んでなる方法。

13. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイ
バー東を構築する方法であって；

異なる結合パートナーを有する分離されたファイバーを、センサ末端をともに
整列させて組み合わせることが、そのセンサ末端をランダムに集めることを含ん
でなる方法。

14. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイ
バー東を構築する方法であって；

異なる結合パートナーを有する分離されたファイバーを、センサ末端をともに
整列させて組み合わせることが、そのセンサ末端を集めて、階段型のセンサ面を
形成することを含んでなる方法。

15. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイ
バー東を構築する方法であって；

異なる結合パートナーを有する分離されたファイバーを、センサ末端とともに整列させて組み合わせることが、前記センサ末端を集めて平坦なセンサ面を形成することを含んでなる方法。

16. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイバー束を構築する方法であって；

再び組み合わせた別個のファイバーの伝送末端を問合せのためにアドレス指定することが、別個のファイバー各々の伝送末端を光アレイにアドレス指定することを含んでなる方法。

17. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイバー束を構築する方法であって；

類似の結合パートナーを有する各群の光ファイバーの伝送末端が、結合パートナーに対応する伝送末端を区別する類似のマーキングを有している方法。

18. 請求の範囲9記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイバー束を構築する方法であって；

異なる結合パートナーの複数のバッチを提供することが、試料中の核酸がハイブリッドを形成できる核酸の結合パートナーのバッチを含んでなる方法。

19. 請求の範囲18記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイバー束を構築する方法であって；

核酸結合パートナーが各々、染色体の特定の領域に対応している方法。

20. 請求の範囲18記載の、試料中の複数の結合パートナーを感知する光ファイバー束を構築する方法であって；

核酸結合パートナーが各々、発現される配列に対応している方法。

【発明の詳細な説明】

光ファイバーバイオセンサ用高密度アレイの製造法と読み出法

本発明は一部、米国国立衛生研究所から与えられた助成（すなわち契約）第CA 45919号に基づいた政府援助によってなされた。米国政府は本発明に特定の権利をもっている。

本発明は、光ファイバーに結合された生物学的“結合パートナー”(biological “binding partner”)（他の分子と特異的に結合して、結合複合体、例えば抗体-抗原、レクチン-炭水化物、核酸-核酸、ビオチン-アビシンなどを生成する分子）を含んでなるバイオセンサの製造と使用に関する。本発明は、各種生体分子を、個体表面特に光ファイバーに結合する方法の改良方法を提供するものである。光ファイバーのバッチは、同じ種の結合パートナーで大量処理され、それらの特定のバッチからシンギュレート(singulate)され、次いで他の種の結合パートナーを有する他のバッチ由来の同じ光ファイバーとともに集めて再び群にする。

本発明は、米国国立衛生研究所が与えた助成第CA 45919号および米国エネルギー省が与えた助成第DE-AC0376SF0098号による政府援助でなされた。米国政府は本発明に特定の権利をもっている。

発明の背景

バイオセンサは、分析対象物質の物理特性ではなくて分子認識性に基づいて、高い選択性で化学種を検出するセンサである（例えば、A.P.F.Turner編“Advances in Biosensors”、英国ロンドン所在のJAI Press社1991年参照）。酵素電極、光学的イムノセンサー、リガンド-受容体電流計およびエバネッセント波プロープを含む。

多種類のタイプのバイオセンサ装置が近年開発されている（UpdikeおよびHicks, Nature, 214巻986頁1967年；Abdel-Latifら、Anal.Lett., 21巻943頁1988年11月；Giaever, J.Immunol., 110巻1424頁1973年；Sugaoら、Anal.Chem., 65巻363頁1993年；Rogersら、Anal.Biochem., 182巻353頁1989年）。

光ファイバーに結合させた生物学的“結合分子”を含んでなるバイオセンサは

、当該技術分野で公知であり、最も一般的なのはエバネッセント波検出器である（例えば、Hirschfeldの米国特許第4,447,546号およびBlockらの米国特許第4,582,809号と同第4,909,990号参照）。このようなバイオセンサは、感度と選択性を最高にするため、一般に、センサの表面に固定させた生物学的結合分子の单一種を利用する。

かような“单一種”的バイオセンサは、非特異的な結合に対して補正または校正を行う固有の手段をもっていない点で限定される。したがって单一種のバイオセンサは、外部標準に対して校正しなければならないし、その上に、单一の分析対象物質の検出に限定される。

二つ以上の種の生物学的結合パートナーを含んでなるバイオセンサはこれらの制限を克服する。“複数種”（“multi species”）バイオセンサは、原則として、センサ中に組み込まれた生物学的結合パートナーの種と同数の異なるタイプの分析対象物質の検出を同時に行うことができる。その上、複数種の結合パートナーに結合する単一の分析対象物質の量を比較すれば、非特異的結合の尺度が提供され、したがって非特異的結合によって持ちこまれる測定の変動に対する固有のコントロールとして作用する。

その上に、特定の検定法でバックグラウンドの信号を生成することが分かっている各種の分析対象物質に対して特異的な生物学的結合

パートナーを有するファイバーを入れると、バックグラウンドシグナルを測定し同時に差し引く手段が提供される。異なる種の結合パートナーを有するファイバーを多数提供すれば、バックグラウンドまたは他の信号に寄与する多数の部分の検出、および、その信号に対する各部分の寄与の詳細な分析を行うことができる。

最も有効であるために、複数種バイオセンサは、そのセンサが、プローブを含有する結合パートナーの各種の種の各々に対し分析対象物質が結合することを示す別個の信号を提供することを要求する。したがって結合パートナーの種は各々、個々に“アドレス指定”されねばならない。

さらに、少量の試料物質は“センサ表面”（生物学的結合パートナーを有している表面）を十分に浸漬する必要があるので、比較的表面積が小さいセンサ表面

は小容積の試料の測定が容易に行える。また、小表面積の検出器も、生体外での測定に使用すると有利であることを示している。占める面積が小さく、各種の生物学的結合パートナーを多数もっている検出器の製造は、生物学的パートナーの高密度アレイの製造とみなすことができる。

結合パートナーの種が各々一意にアドレス指定される、生物学的結合パートナーの高密度アレイを創製する場合、困難な製造上の問題点が起こる。現在までのところ、最も成功した方法は、Affymax Inc.が開拓した大規模な写真平板固相合成法である（例えば、Fodorら、Science, 251巻767～773頁1991年および米国特許第5,143,854号参照）。この方法では、ペプチドまたは核酸のアレイが、固体支持体上に化学的に合成される。基板の特に選択された場所で成長する分子の光に対して不安定な保護基を選択的に除く写真平板法を使用することによって、異なる分子が、基板上の予め決められた異なる場所で同時に合成される。得られる分子のアレイは”空間的

にアドレス指定されている(spatially address)”。換言すれば、各生物学的分子の本質は、基板上のその位置によって決定される。

しかし、写真平板法は、化学的に合成できる分子に限定される。したがってこの方法は、一般に、約50個のアミノ酸より短いペプチドおよび約150個の塩基対より短い核酸に限定される。その上に、写真平板法は一般に、平面基板（例えばスライドガラス）上に上記アレイを生成させて、特定の生物学的結合パートナーの結合によって、生成する信号が伝導される固有の機構が全くない。

Waltらの米国特許第5,250,264号は、“センサの表面上の個々の空間位置に固定化された複数の異なる染料”を用いる、光ファイバーアレイを備えてなるセンサを開示している。各染料は異なる分析対象物（例えば、pH、O₂CO₂など）に応答することができるので、そのセンサは、全体として、多数の分析対象物質を同時に測定することができる。

Waltらが開示したセンサはバイオセンサではないが、この文献には、一意的にアドレス指定される“検出部分”を複数有するセンサを製造する方法が開示されている。Waltらの特許では、まず光ファイバーを集めて束（bundle）が製造され

る。次に、一つのファイバーまたはファイバーパー群の伝送末端が特異的に照明される。照明された各ファイバーは、光をそのそれぞれのセンサの末端に伝送し、そこで光がセンサの染料混合物を“光重合させて”、染料をセンサの末端に結合させる。この方法は、異なる光重合された染料に対して異なる繊維で繰り返される。この繰返しは、センサアレイが構築されるまで続く。

この方法には、光重合性のセンサ染料が必要であるという制限があるので、異なる染料のタイプの数によって、異なる種の数1プローブの数が限定される。その上にこの文献は、一意的にアドレス指

定される生物分子（例えば、ペプチド類、核酸類、抗体類）をセンサに結合させる方法を提供していない。したがって、Waltらはバイオセンサを製造する方法を提供していない。

発明の要約

本発明は、光ファイバーに結合させた複数の生物学的“結合パートナー”（他の分子に特異的に結合して、結合複合体、例えば抗体-抗原、レクチン-炭水化物、核酸-核酸、ビオチン-アビジンなどを生成する分子）を含んでなるバイオセンサの新規な製造方法を提供するものである。特に、本発明の方法は、生物学的結合パートナーの種が各々、一意的にアドレス指定されている、生物学的結合パートナーの高密度アレイの製造方法を提供するものである。従来技術の特定の方法とは対照的に、本発明で利用される生物学的結合パートナーは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチド類またはペプチド類に限定されず、核酸類、抗体類、タンパク質類、レクチン類、および天然状態の、または組換えDNA法によって修飾されてなった他の状態の細胞、組織または生物由来の他の結合パートナーが含まれている。

また、本発明は、各種の生物分子（例えば核酸類）を固体の表面に結合させる方法の改良方法も提供するものである。本発明の方法は、対象の生物分子と有機または無機のマトリックス重合体を含有してなるマトリックス溶液を使用する。一般に、そのマトリックス溶液は、適当な溶媒（例えばDMSO）中のマトリックス重合体（例えばニトロセルロース）、および核酸または他の生物分子の水溶液の

両者を含有してなる単相溶液である。本発明のマトリックス溶液は、核酸ハイブリッドの形成、免疫検定法などで固体表面として通常使用されるあらゆる固体表面に、核酸類および他の生物重合体類を

結合させるのに使用することができる。代表的な固体表面としてはガラス（例えば、光ファイバー、スライドおよびビーズ）、プラスチック、石英などがある。

特に、本発明のバイオセンサは、ともに束ねられて一つの光ファイバーアレイが形成された多数の光ファイバーで構成されている。この光ファイバーアレイを構成する、各光ファイバーまたは光ファイバーパー群のセンサ末端は、特定の種の生物学的結合パートナーを有している。分析対象物質が生物学的結合パートナーに結合することによって生成する光信号は、それぞれの光ファイバーにそって、検出器に連結された伝送末端に伝導される。生物学的結合パートナーの種の各々に対応するファイバーからの信号が検出されると、多数の分析対象物質の結合が同時に測定される。

本発明は、光ファイバーバイオセンサの製造方法を提供するものである。本発明の方法では、多数の光ファイバーを集めまとめて複数の別個のファイバーパー群またはパッチが提供される。各ファイバーは、センサ末端と伝送末端を有し、そして各群のファイバーは、それらのセンサ末端がともに整列するように配向される。次に、各群のファイバーを処理して、單一種の生物学的パートナーを、構成要素のファイバーのセンサ末端に結合させる。あるいは、一つのファイバーパー群に結合された多数の種の生物学的結合パートナーが、他のファイバーパー群に結合された多数の種と異なっている限り、多数の種の生物学的結合パートナーを各群に結合させてもよい。

次にファイバーまたはファイバーパー群を、それらそれぞれのパッチから選択して別々に分離する。次に、各群から別々に分離された一つ以上ファイバーを、それらのセンサ末端で、他のパッチ由来の他のファイバーとともに再び組み合わせて光ファイバーアレイを製造する。それらのセンサ末端は、実質的に平面の配向で配列してもよ

く、または階段的に合して、階段的センサ面を形成させてもよい。本発明の光ファイバーアレイは、その異なるファイバーの各種結合パートナーに、試料の成分が結合するのを同時に検定できるファイバーを含有している。

各ファイバーのバッチ独自性は、結束工程中、好ましくは諸ファイバーの伝送末端またはその近くで維持される。次に、これらの伝送末端は、多数の光センサなどの検出器に別々にアドレス指定される。特定の生物学的結合パートナーに対応する伝送末端の位置と空間のアレイは、互いに別個のものであり既知である。

したがって、本発明は、各生物学的結合パートナーを一意的にアドレス指定する、生物学的パートナーの高密度アレイの製造方法を提供するものである。結合パートナーがその基質と結合して結合複合体を形成することによって発する光信号は、光ファイバーまたはファイバー群を通じて検出器に送られ各々別個に試験される。したがって、分子が特定の生物学的結合パートナーに結合すると、特異的に検出可能である。ファイバーまたはファイバー群のアドレス指定された伝送末端を試験することによって、そのアドレス指定された伝送末端は、そのセンサが分析対象物質の迅速な試料同定をするのを補助する独特のパターンを伝送できる。

一実施態様で、光ファイバーは、試験試料中の核酸がハイブリッドを形成できる核酸結合パートナーを有している。用語“核酸”または“核酸分子”は、本明細書で使用する場合、一本鎖または二本鎖型のデオキシリボヌクレオチド重合体またはリボヌクレオチド重合体を意味し、そして特に断わらない限り、天然のヌクレオチド類と同じように機能できる天然ヌクレオチドの公知の類似体が含まれる。

特に好ましい実施態様で、バイオセンサは以下のものを含んで構

成されている。すなわち、各ファイバーがセンサ末端と伝送末端を有する複数のファイバー；第一生物学的結合パートナーを結合された少なくとも一つの第一ファイバーのセンサ末端および第二生物学的結合パートナーを結合された少なくとも一つの第二ファイバーのセンサ末端；第一と第二のファイバーの伝送末端をアドレス指定する第一と第二の位置を有する伝送アレイ；第一と第二のファイバー

の伝送末端を伝送アレイにアドレス指定する手段；これらファイバーのセンサ末端における分析対象物質の比較結合を検査するための伝送末端に隣接する光問合せ手段である。第一と第二のファイバーのセンサ末端を配列させて、階段的センサ面を作製できる。第一と第二の結合パートナーは、核酸類、例えばDNAおよびcDNAでもよい。これらの核酸類は、一つ以上のヒト染色体の特定領域に位置づけられるか、またはcDNAまたはmRNAなどの発現される配列でもよい。特に好ましい実施態様で、標的の核酸類はコンプレキシティー（複雑度）が約1,000～1,000,000のヌクレオチドである。

核酸を有するアレイが、染色体異常、特に、特定の染色体領域のコピー数が増減する異常を検出する比較ゲノムハイブリッド形成（Comparative Genomic Hybridization(CGH)）検定法で特に有用である。この方法の一つの実例では、（プローブ）核酸類の第一コレクションが第一標識で標識化され、一方、（プローブ）核酸類の第二コレクションが第二標識で標識化される。上記のような、バイオセンサは、生物学的結合パートナーが標的核酸のバイオセンサである（用語“標的核酸”は本明細書で使用する場合、一般に、光ファイバーアレイを構成する光ファイバーに結合される核酸を意味し、一方、“プローブ核酸”は、標的核酸とハイブリッドを形成する、溶液中で自由な核酸である）。核酸類のハイブリッド形成の比率は、アレイ中の各ファイバーに結合している前記二つの（第一と第二の）標識の比率によって測定される。染色体の欠失または増殖がある場合、前記二つの標識からの信号の比率の差が検出される。これらの比率を生じるアレイの特定の光ファイバーを確認すると、そのプローブがもっている核酸配列したがって変更される核酸配列が分かる。

標的核酸類（光ファイバーに結合される核酸類）としては、DNAとcDNAがあり、ヒト染色体の特定領域に位置づけられる。その上、標的核酸は複雑度（complexity）が好ましくは約1,000～1,000,000のヌクレオチドである。標的核酸に相補的な配列の複雑度は、試料中の配列の全複雑度の1%より低いことが好ましい。

第一と第二の標識としては蛍光標識が好ましい。特に好ましい実施態様で、第一プローブの核酸は試験細胞由来のmRNAまたはcDNAを含んでなり、そして第二プローブの核酸は

ロープの核酸は対照細胞由来のmRNAまたはcDNAを含んで構成されている。他の好ましい実施態様で、第一プローブの核酸は試験ゲノム由来の核酸であり、そして第二プローブの核酸は対照ゲノム由来の核酸である。試験ゲノムは胎児組織または腫瘍由来の核酸を含有していてもよい。

本発明の一つの態様によって、アレイ中の各ファイバーの間合せ末端が多数の生物学的“結合パートナー”を含有している光ファイバーのアレイが開示される。各結合パートナーは、特定の結合パートナーに接続されるように、伝送末端において、特異的にアドレス指定されたかまたは識別された一つ以上の光ファイバーに結合される。適正にアドレス指定されかつ問合わされた伝送末端で測定が行われる。

一つの特別の実施態様で、核酸分子を有する光ファイバーのアレイを開示する。これらの光ファイバーは、それらの間合せ末端に、長さが最小か(例えば400 bp)または特定のライブラリー(例えば

特定の染色体にそって均一に間隔をおいて位置しているかまたは特別の遺伝子を示す)由来の核酸のような特別の核酸を有している。

開示された装置および方法の利点は、構築されるアレイが、生物学的結合パートナーの広範囲のアレイを迅速に選別するように要求に合わせて作製することができることである。容易に確認される情報を用いて、試料のゲノム全体を通じての核酸の変化を同時にかつ迅速に調べることができるアレイを組み立てができる。例えば、30,000の標的核酸(各々100kbのゲノムDNAを含有する)を有する光ファイバーセンサは、ヒトゲノムを完全にカバーすることができる。

図面の簡単な説明

図1は、結合パートナーを結合させるための接合処理を行うためセンサ末端が結束され、そして指定された群のファイバーをその後その群から分離させるとき、類似の群のファイバーから区別することができるよう、伝送末端に別々に印が付けられている一群のファイバーを示す概略図である。

図2は、処理溶液の複数の異なるバッチを示し、図1に示すファイバーパターンセンサ末端がファイバーバッチのうちの一つに浸漬され処理されている。

図3は、処理済ファイバーの異なる群が横に並んでいるのを示し、各群からファイバーをシンギュレートし共通の高密度アレイ中に集められている。

図4は、組み立てられた高密度アレイを、センサ末端と伝送末端だけ示し、センサ末端は問合せ光によって透照するため階段的に配置されかつ検出末端は識別されてセンサアレイに別々にアドレス指定され、この図に示すセンサアレイは、ファイバーの照明を検出

面にリレーする収光レンズの対応するアレイを有している。

図5は、比較ゲノムハイブリッド形成法を実施しているところを示し、比較される二つの試料は異なる発蛍光団で予め標識化されて共通の浴に入れる。

図6Aと6Bは、図5に示す共通浴の拡大詳細図であり、アレイのセンサ末端における階段的サンプリングファイバーが透照され、ファイバー自体を過度に直接照射することなしに、結合パートナーに結合された発蛍光団が励起される。

図7Aと8Aは、光ファイバーアレイまたは他の光源アレイ（例えば混成蛍光プローブのアレイ）とともに用いられる検出器を示す。

好ましい実施態様の説明

本発明は、光ファイバーバイオセンサ、バイオセンサの製造方法、および独特の光ファイバーバイオセンサを用いて生物分子の定性測定と定量測定を行う方法の優れた改良発明である。特に、本発明は、生物学的結合パートナーの高密度アレイを含んでなるバイオセンサの新規の構築法を提供するものである。

本発明のバイオセンサは、一般に、同軸整列 (coalligned) 光ファイバーの束で構成されている。バイオセンサ内の個々の各光ファイバーまたはファイバー群は、生物学的結合パートナーの単一の種を有している。生物学的結合パートナーという用語は、本明細書で用いる場合、他の分子を特異的に認識し、その分子と結合して、結合複合体を形成する分子を意味する。一般的な結合複合体としては、限定されないが、抗体-抗原、レクチン-炭水化物、核酸-核酸、ビオチン-アビシン、受容体-受容体リガンドなどがある。

“特異的に認識して結合する”という用語は、生物学的結合バー

トナーが特定の分子に結合し、その生物学的結合パートナーが通常、暴露される他の分子には結合しないことを意味する。核酸の場合、特異的結合はハイブリッド形成による結合であり、そして用語“特異的なハイブリッド形成”または“特異的にハイブリッドを形成する”は、プローブ核酸が、明確なストリンジエンシィ条件下、標的核酸と実質的に結合し、バイオセンサ内に存在する他の核酸と実質的に結合しないハイブリッド形成を意味する。当該技術分野の当業者は、ハイブリッド形成条件のストリンジエンシィが弛緩すると、配列のミスマッチを許容してしまうことが分かるであろう。ミスマッチの許容度は、ハイブリッド形成条件を適切に調節することによって制御できる。

用語“種”は、本明細書で使用する場合、特定の標的分子に特異的に結合できる生物学的結合パートナーを意味する。したがって、例えば、生物学的結合パートナーは、ともに核酸であってもよいが、異なる分子と特異的にハイブリッドを形成するように異なるヌクレオチド配列をもっている場合、異なる種とみなされる。同様に、異なるエピトープに対して特異的な二つの抗体は異なる種と見なされる。

好ましい実施態様で、本発明のバイオセンサは、生物学的結合パートナーの二つ以上の異なる種を有している。結合パートナーの2種以上の種を使用すると、試験試料中の2種以上の分析対象物質の検出を同時に行うことができ、検出可能な分析対象物質の数は、バイオセンサ内に存在する異なる生物学的結合パートナーの数にだけ限定される。本発明のバイオセンサは、生物学的結合パートナーを欠いている追加の光ファイバーを任意にもっていてもよい。これらの追加のファイバーは、温度またはpHなどの試験試料の各種物理的パラメータを検出する部分をもっているか、あるいは、あらゆる部

分を欠いていて、単に可視化のための光学的導管として働き、その結果、各種の生体内用途でバイオセンサプローブの挿入を案内する内視鏡として働く。

複数の生物学的結合パートナーを有するバイオセンサは、試料中の多種類の分析対象物質を同時に検定することができる。さらに、単一の分析対象物質の、いくつもの異なる種の生物学的結合パートナーとの結合度を測定すると、非特異的

結合の対照標準が得られる。試験試料中の異なる分析対象物質の結合度を比較することによって、異なる分析対象物質の相対的増減を評価することができる。結局、光ファイバーの断面積が小さいので、多数の光ファイバーを結束して光アレイにすると、各光ファイバーは、異なる生物学的結合パートナーを有し、広範囲の生体外および生体内の検定に適した、生物学的結合パートナーの高密度アレイを製造するのに有効な機構を提供する。

I. バイオセンサの構成

本発明の独特の光ファイバーバイオセンサ、その構成、その構造およびその構成要素を図1～6に示す。各々別個の光ファイバーバイオセンサが、その全長にそって同軸方向に配置された複数の光ファイバーストランド10で構成され、單一の別個の構造を形成している。したがって、本発明のバイオセンサは、光ファイバーアレイ14すなわち單一の光ファイバーストランド10が入っている最小の共通繰返し単位を有している。

好ましい光ファイバーバイオセンサを図4に示す。図4から分かるように、個々の光ファイバーストランド10は、ロッド状シャフトと二つのファイバー末端（各々、実質的に平坦な端面を有しセンサ末端11および伝送末端12と呼称される）を有する單一の光ファイバーで構成されている。光ファイバーストランド10は一般にガラス製

またはプラスチック製であり、その末端11、12のどちらかに導入された光エネルギーを運ぶことができる可撓性ロッドである。かような光ファイバー10は公知であり購入することができる。あるいは、ユーザー自身、科学と産業の文献に報告されている通常の慣行と方法にしたがって光ファイバーを製造することができる。したがって、光ファイバー10は公知でありそれ故入手可能であると考えられる。

図1～6は、細部にわたって明確に目視可能にするため、その形状構成を、故意に、その通常の尺度を超えて拡大し強調した図であることは分かるであろう。一般に、通常の光ファイバーは、断面の直径が5～500μmであり、数cm（例えば実験室で）～数km（例えばフィールド電気通信で）の範囲の長さで日常的に利

用されている。しかし、一般に、光ファイバーがバイオセンサに利用される場合、数cm～数1mの長さの範囲が好ましい。

光ファイバー10は、実質的に円形の端面を有する円筒形の引きのばされたロッドとして、図1～4に示されているが、この特別の配置形態を維持すべきであるという要求または要望はない。そうではなくて、光ファイバーはその全長にわたって多角形または非対称形で、センサ末端または伝送末端が特定のパターンと形であってもよく、そして実質的に平坦な端面を提供する必要はない。しかし、好ましい実施態様で、光ファイバーは実質的に円筒形である。

各光ファイバー10は、その全長にわたって軸方向に個々に被覆されている。その被覆物は、屈折率が低く、かつ光ファイバー10から外部環境への光エネルギー光子の透過を防止する材料であればよい。したがって、その被覆物は、各種のガラス類、シリコーン類、プラスチック類、布地類、メッキ類および多様な化学組成物と配合物の遮蔽物で構成されている。析出法、押し出し法、塗布法およびカバ

ー法を含む被覆法が科学上および産業上利用可能であり、これらの公知の方法はユーザーの要求と便利さを満たすよう選択できる。

ユーザーは、光ファイバー10のセンサ末端11の配置形態について、ユーザーの判断によって各種の選択を行う。上記のように、センサ末端11は実質的に平坦でかつ滑らかな面を提供する。あるいは、センサ末端11はほゞ凸面または凹面の端面を提供することができる。

光ファイバー10の寸法と配置形態の変化の範囲と種類は、次にストランドの指定のセンサ末端11に生物学的結合パートナーを配置し固定化するユーザーの能力によってのみ限定されると解される。凸面または凹面のセンサ末端11を使用すると、生物学的結合パートナーを固定化するための表面積が大きくなりその結果、バイオセンサの効率(S/N比/光ファイバー)が増大する。

光ファイバーバイオセンサの单一の繰返し要素は個々の光ファイバー10であるが、多数の分析対象物質を同時に検出することができる別個の光ファイバーアレイ14を形成するのは、複数のかのようなファイバーの集合体である。これら光ファイバーを集めて、別個の光ファイバーアレイ14を製造するとき、ファイバーの同

軸に並べたセンサ末端11を集めてセンサ面13を形成させる。一般的なバイオセンサを図4および図6Aと6Bに示し、これらの図中、センサ面13は尺度なしの誇張され高度に単純化された図で示されている。光ファイバーアレイ14は、センサ面13と伝送面15を形成する一体のロッド様収集体で構成されている。

事実上、直径0.5mmの通常の画像形成ファイバー中に一般的に1000～3000本の光ファイバーストランドがあり、ほゞ百万ストランド/mm²であると推定される。本発明の光ファイバーアレイ14を形成する個々の光ファイバーストランドの合計数はほゞ同じであり、そ

の合計数は、各光ファイバーの断面の直径、個々の光ファイバーの収集体中の充填パターンおよび被覆材料（使用する場合）の厚みによって変わる。約33本の光ファイバーからなる群が各々、異なる種の生物学的結合パートナーで標識化されているほゞ百万本のストランドを含有する1mm²のバイオセンサが、1mm²当たり約30,000の異なる種の生物学的結合パートナーを含んでなるセンサ面13を形成することが分かるであろう。先に説明したように、かようなセンサは、10メガ塩基の間隔で全ヒトゲノムをカバーする核酸の生物学的パートナーを提供できる。

センサ面13は平坦面として配置する必要はない。そうではなくて、個々の光ファイバーは、距離を変えて光アレイから突出させるように“階段状”にしてもよい。このようにすると、試料流体および図6Aと6Bに示すように透照光源19に対する各光ファイバーセンサ末端11の暴露が最大になる。

好ましい実施態様で、光ファイバーアレイ14を構成する光ファイバーのセンサ末端11は、ランダムなパターンまたは偶然のパターンで結束されてセンサ面13が形成される。あるいは、各ファイバーのセンサ末端11を、センサ面13の特別に予め決められた位置を占めるように高度にきちんと並べて配置してもよい。上記のように、センサ面13を形成する光ファイバー10すなわち光ファイバーアレイ14のセンサ末端11には生物学的結合パートナーが結合されている。

光ファイバーアレイ14を構成する各光ファイバーまたはファイバー群は、異なる種の生物学的結合分子を有していてもよい。单一の光ファイバーまたは單一群のファイバー当たり单一種の生物学的結合パートナーを用いる方法が好ましいが、

代わりに、各光ファイバーまたは各ファイバーパー群は、多様性が生物学的結合パートナー異なり、すなわち、光ファイバーアレイ14を構成する他のファイバーもし

くはファイバーパー群に存在する生物学的結合パートナーの多様性と異なっている限り、多様な生物学的結合パートナーをもっていてもよい。同じ種の結合パートナーを有するファイバーが、物理的にグループ分けされて、特定の生物学的結合パートナーの存在が特徴であるセンサ面13の別個の領域を生成するか、代わりに、異なる結合パートナーを有するファイバーが混合されて、そのセンサ面13が、生物学的結合パートナーの種の比較的均一な分布、偶然の分布またはランダムな分布を示してもよい。

光アレイの伝送面15は、さらに連結されることがない実質的に平坦な光アレイであってもよい。しかし、好ましい実施態様で、伝送面15は、図4に示すように、永久的にまたは取外し可能に検出器20に連結される。その検出器は、光ファイバーアレイ14を構成する光ファイバーにそって伝送される光信号を集めて増強する一つ以上のレンズを備えていてもよい。その検出器はさらに、上記光信号を、デジタルまたはアナログの電気信号に変換する装置を備えていてもよい。好ましい検出器は、光電管（光電子増倍管）または電荷結合デバイス（CCD）を備えている。単一の光電子増倍管またはCCDの要素を配置して、バイオセンサの全伝送面15が提供する集合体信号を測定することができる。あるいはCCD（または他の）カメラの焦点をバイオセンサの伝送面に合わせて、すべての光ファイバーからの信号を同時に読み取って、各ファイバーまたは各ファイバーパー群からの信号を個々に評価することができる。別の実施態様において、複数のCCD要素または光電管を用いて、バイオセンサのセンサ面13に存在する单一種の生物学的結合パートナーが結合していることを示す信号を検出することができる。したがって、上記検出器は、単一の光ファイバー10または光ファイバーパー群（一群中の光ファイバー10はすべて同じ種の生物学的結合パートナーをもっている）からの信号を読み取るよう配置することが好ましい。

検出器20は、光ファイバーアレイからの光信号を検出するのに加えて、一般に

、光源のアレイからの光信号を増幅し検出するのに使用できる。したがって、例えば光源のアレイは、標的核酸のアレイとハイブリッドを形成させた蛍光標識化プローブのハイブリッド形成による蛍光スポットのアレイでもよい。同様に、このアレイは、抗体が結合するタンパク質のアレイに結合した蛍光標識化抗体のアレイまたは逆に、抗体のアレイに結合した蛍光標識化タンパク質のアレイでもよい。

図7Aと7Bに示す、上記用途に適切な好ましい実施態様で、検出器20は、単レンズ32のアレイからなる複合対物レンズ31を備えている。これら単レンズは、各レンズが、蛍光を測定すべきアレイ中の場所34に焦点が合うように配置される。検出器は、任意に、ビームスプリッター35、第二レンズ36、光学フィルター37およびカメラ38などの検出装置を備えている。ビームスプリッターは、この場合、励起光39を光源のアレイに導くのに使用される。各スポットで得られた蛍光を、複合対物レンズ31を通じて集束し、任意に第二レンズで集束し、任意に光学フィルターでフィルターし、次いで視覚でまたはカメラなどの検出手段で検出する。

複合対物レンズは、レンズを製造するのに適していることがよく知られているガラス、プラスチック、石英などの材料を用いて注型、圧縮、エッチングまたは研削によって製造される。複合レンズは、单一ピースとして製造することができ、あるいは複数の単レンズを接合することによって組み立てて複合対物レンズを作ることができる。

II. バイオセンサの製造

図1～4は、生物学的結合パートナーを有する複数の光ファイバーを含んでなるバイオセンサの製造方法を示す。一般に、この方法では、各ファイバーがセンサ末端と伝送末端を有する複数の光ファイバーであって、各ファイバーのセンサ末端に特定の種の生物学的結合パートナーが結合されている複数の光ファイバーを準備する。異なる結合パートナーを有するファイバーを組み合わせて光ファイバーのアレイを製造し、そのアレイにおいて前記ファイバーは、試料を同時に検定するため、ともに並べられたセンサ末端を有している。上記組み

合わせた別個のファイバーの伝送末端は、問合わせのためアドレス指定されて、光ファイバーセンサを生成する。

図1は、生物学的結合パートナーを連結された光ファイバーを提供する一方法を詳述する特に好ましい実施態様を示す。各ファイバーがセンサ末端11と伝送末端12を有する複数の光ファイバー10を準備する。これらのファイバーを、図2に示すように配置して複数のファイバー群すなわちファイバーの束16を製造する。そしてこの場合、各束の中のファイバーは、互いに並行に、同軸方向に配置され、各ファイバーのセンサ末端11は前記ファイバーの束の同じ末端でともに並べられている。各束を構成するファイバーは、任意に印を付けて(17)、その後、その束から取り出されたときそれらを確認することができるようにしてよい。

図2に示すように、ファイバーの各束は、別個に処理して、特定の束を構成する光ファイバーのセンサ末端11に特定の種の生物学的結合パートナー18を結合させる。生物学的結合パートナー18を、各種の固体表面上に固定化する多数の方法が、当該技術分野で公知である。一般に所望の要素は、非特異的結合によって共有結合または非共有結合される。

結合パートナーを結合させるセンサ末端11を製造する場合、複数の異なる物質を、特にラミネートとして利用して各種の特性が得ら

れる。例えば、タンパク質(例えばウシ血清アルブミン)または巨大分子の混合物[例えばデンハートの溶液(Denhardt's solution)]を用いて、非特異的結合を避け、共有結合の接合を単純化し、信号の検出を高めることなどを行うことができる。

生物学的結合パートナーとセンサ末端11の表面との共有結合が望ましい場合、その表面は通常、多官能性であるかまたは多官能性にすることができる。その表面に存在し結合に使用できる官能基としては、カルボン酸基、アルデヒド基、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基などがある。

結合パートナーとセンサ末端の共有結合は、直接の結合かまたは共有結合リンカーを通じての結合である。一般にリンカーは、ヘテローまたはホモ一二官能分子であり、各々、それぞれの結合パートナーと共有結合を形成できる二つ以上の

反応性部位を含有している。生物学的結合パートナーを結合させるのに適したリンカーは当該技術分野の当業者にとって公知である。例えば、生物学的パートナーは、ペプチドのリンカー、直鎖もしくは分枝鎖の炭素鎖リンカー、または複素環炭素によって結合することができる。N-エチルマレイミドの活性エステル類のようなヘテロ二官能架橋剤が広く使用されている（例えば、Lernerら、Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 78巻 3403~3407頁 1981年およびKitagawaら、J. Biochem., 79巻 233~236頁 1976年参照。なおこれら文献は本明細書に援用するものである）。

各種の表面に、多種類の化合物を結合させる方法は公知であり、文献に十分説明されている。タンパク質類は、例えば、そのアミノ末端もしくはカルボキシル末端を通じて、または各種構成要素のアミノ酸の側鎖を通じて、リンカーにまたはセンサ末端¹¹の官能基に結合させることができる。したがって、システインに対するジスル

フィド結合による結合が通常行われる。

同様に、各種の官能基を分子に導入することによって核酸を固定化する方法が知られている（例えば、Bischoffら、Anal.Biochem., 164巻336～344頁1987年；Kremskyら、Nuc.Acids Res., 15巻2891～2910頁1987年参照。なおこれらの文献は本明細書に援用するものである）。修飾ヌクレオチドを含有しているPCRプライマーを用いるか、または酵素を用いて修飾ヌクレオチドで末端の標識化を行うことによって、修飾ヌクレオチドを標的に配置することができる。

核酸などの生物分子を固体表面に固定化する好ましい方法では、対象の核酸と有機もしくは無機のマトリックス重合体とを含有するマトリックス溶液が用いられる。一般に、このマトリックス溶液は、マトリックス重合体および核酸などの生物分子の両者を含有する単相溶液である。いくつかの実施態様で、マトリックス溶液は、適当な溶媒中のマトリックス重合体および生物分子の水溶液を混合することによって製造される。この目的のために有用な、マトリックス重合体用の代表的な溶媒としては、DMSO、DMFおよびテトラメチレンスルホンのような極性有機溶媒ならびにアセトニトリル／水の溶液およびBlighとDyerの単相溶液があ

る。

あるいは、所望の核酸または他の生物分子の濃縮水溶液ならびにキシレン、トルエンまたはクロロホルムなどの非極性有機溶媒によるマトリックス重合体の溶液からなる二相溶液を使用できる。これらの実施態様のうち、上記二相溶液は、超音波処理を行うかまたは他の方法で乳化させて、マトリックス重合体と核酸を確実に接触させねばならない。

天然および合成の多種類の有機および無機の重合体が、上記溶液中のマトリックス重合体物質として利用できる。低蛍光性の好まし

い重合体の例としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、レーヨン、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)、シリコーン類、ポリホルムアルデヒド、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロースなどがある。

本発明のマトリックス溶液は、核酸のハイブリッド形成、免疫検定などの場合に、固体表面として通常用いられる固体表面に、核酸などの生物重合体を結合させるのに使用できる。代表的な固体表面としては、ガラス(例えば、光ファイバー、スライドガラスおよびビーズ)、プラスチック、石英などがある。

光ファイバーのセンサ末端または他の固体表面に、核酸などの生物分子を結合させる特に好ましい方法は、ニトロセルロースのDMSO溶液を、生物分子または分子の濃縮水溶液と混合することによる方法である。得られたマトリックス溶液をファイバーのセンサ末端にスポットして乾燥する。ニトロセルロース：生物分子の比率は、その生物分子を固体表面に結合させると、確実に、その結合パートナー(例えば相補的核酸)と特異的に結合できるように調節することが好ましい。核酸の場合、マトリックス重合体(例えばニトロセルロース)：核酸の比率は、一般に、約1:10～約2:1の重量比であり、通常約1.5:10～約1:1の重量比である。

代表的なプロトコルは次のとおりである。50m1のDMSOに溶解した約2gのニトロセルロースからなる貯蔵溶液を、DMSOを用いて約100:1の比率で希釈する。

次に、その希釈溶液を適当な量の核酸と混合して、ニトロセルロース：核酸の最終比率を上記範囲内にする。例えば、 $4\text{ }\mu\text{l}$ の上記希釈DMSO溶液($1.6\text{ }\mu\text{g}$ のニトロセルロースを含有している)を $10\text{ }\mu\text{g}$ のDNAと混合する。あるいは、上記DMSO

溶液を、DNAの濃縮水溶液と混合して所望の比率にしてもよい。その核酸は、標識化するとかまたは完全に純粋である必要はなく、そしてその水溶液は制限酵素などのタンパク質を含有していてもよい。ニトロセルロースと核酸を含有するマトリックス溶液を、必要に応じて、加熱し核酸を変性させ、次に酸洗浄を行った清浄な表面に塗布する。次にスポットを、約 70°C で約 $0\sim$ 約60分間加熱して溶液を乾燥させる。

図3に示すように、生物学的パートナー18を、各ファイバー束を構成する光ファイバー10のセンサ面11に結合させた後、個々のファイバーまたはファイバーパー群を各ファイバー束から分離する。図3には四つのファイバー束F₁～F₄だけを示す。上記工程でファイバー束F₁～F₄それぞれから個々のファイバー10a～10dが分離される。これらそれぞれのファイバーは、再びグループ化されて光ファイバーアレイ14になる。

個々のファイバーまたはファイバーパー群は、元のファイバー束から分離する前に印を付けて、その後の組立てステップ中に特定のファイバーまたはファイバーパー群に結合される結合パートナーを確認し易くする。その分離されたファイバーまたはファイバーパー群を、異なるファイバー束から分離されたファイバーまたはファイバーパー群と再び組み合わせて、各ファイバーまたはファイバーパー群が異なる種の生物学的結合パートナーを有する、複数のファイバーまたはファイバーパー群を含んでなる光ファイバーアレイ14を製造する。

図4は、光ファイバーアレイ14を構成するすべての光ファイバー10のセンサ末端11を、該アレイ14の同じ末端で先に整列させてセンサ面13を形成するように、該アレイ14のメンバーが配向されているのを示す。これらファイバーは、実質的に平坦な配置形態で、または図6Aと6Bに示すように階段式に配置されていてもよい。

これらのファイバーは実質的に、ランダムにもしくは偶然に、センサ面13で結束され、特定のファイバーのセンサ末端11のセンサ面13内の相対位置は偶然によって決まる。あるいは、これらファイバーは、特定の光ファイバー10の、センサ面13内の位置が予め決められた高度に順序付けた方式でファイバーアレイ内に配置してもよい。

光ファイバーアレイ14を構成する光ファイバーの伝送末端12は、センサ面13に結合された生物学的結合パートナーに対する結合事象を問合させて検出できるようアドレス指定される。アドレス指定は、当該技術分野の当業者にとって公知のいくつもの方法で達成される。好ましい実施態様で、同じ種の生物学的結合パートナーを有するすべての個々の光ファイバーまたは光ファイバーパー群の伝送末端12は空間的にアドレス指定される。これには、光ファイバーまたは光ファイバーの束を、光ファイバーアレイ14を構成する他の光ファイバーまたは光ファイバーの束に対して固定した位置に局限配置することが含まれる（例えば図4参照）。このことは、最も一般的に、ファイバーアレイを、光ファイバーコネクターおよびフェルールに結合することによって達成することができる（例えば米国ペンシルベニア州ハリスバーグ所在のAMP, Inc.社参照）。

あるいは、伝送末端12は、特定の生物学的結合パートナーを有する、各光ファイバー10または光ファイバーの束の伝送末端を、個々の検出器に連結することによってアドレス指定することができる。各検出器は、その後、特定の生物学的パートナーと結合していることが分かるので、伝送末端12間の固定した空間関係を維持する必要はない。

バイオセンサからの信号（光アレイ）の検出は、光ファイバーアレイの伝送面15の目視検査または一つ以上の検出器20を使用するこ

とによって達成できる。上記のように、伝送面は、単レンズまたは多重レンズ系に、永久的にまたは着脱自在に取り付けることができる。これら单一または複数のレンズは、伝送面15全体からまたは伝送面の選択された小区域から光信号を集めるように配置される。好ましい実施態様において、複数のレンズが各々、单一の生物学的結合パートナーに対応する、伝送面15の部分からの光信号を集めるよ

うに配置される。極端な場合、光ファイバーアレイ14を構成する各光ファイバーに対する信号は個々に集められる。

さらに、既存の単一のレンズまたはレンズ系によって、上記信号は簡単に目視で検出できる。しかし、好ましい実施態様では、検出器が使用される。好ましい検出器は、光信号を、デジタルまたはアナログの電気信号に変換する装置である。検出器は、一般に、2種の一般的なタイプ：光電管と電荷結合デバイス(CCD)の検出器である。単一の光電子増倍管またはCCDの要素を利用して、バイオセンサの全伝送面15が提供する集合信号を測定することができる。しかし、多数のCCD要素または光電管を用いて、各々が、光ファイバーアレイ14のセンサ面13に存在する單一種の生物学的結合パートナーの結合を示す信号を検出することが一層好ましい。

上記検出システムは、コンピュータ化されたデータ収集システムや分析プログラムに使用できる。この実施態様において、十分に自動化されてコンピュータで制御された処理装置と測定システムであれば、バイオセンサから得たデータは、直ちに処理されて有用な情報になる。このような十分に自動化されてコンピュータ化された装置と分析システムを用いることによって、単一の流体試料内で、各種の測定が行われかつ同時に多様なパラメータが測定されるだけでなく、多数の異なる流体試料を個々に順次分析して、対象の多数の分析目的物質を同時に検出できる（個々の流体試料は各々順にその

前の試料に続く）。

II. 使用方法

本発明にしたがって製造された光ファイバーバイオセンサを用いて、各種の生体外の測定と分析を行うことができる。生体外での用途と検定法は、一つ以上の流体試料を用いて、同時に行うことができる。各々同時に行われる、異なる対象分析目的物質の測定または確認は、個々に、高い正確さと精密さで行われる。次いで、測定結果を、関連させおよび／または計算して、各種の異なるパラメータまたはリガンドに関する精密な情報が個々に提供される。

また、本発明の光ファイバーバイオセンサは、各種の異なる生体内条件で、ヒ

トと動物の両方に用いることができる。本発明は、限定された目的のため結合された従来の異なるセンサの束ではなくて、単一の別個の光ファイバーバイオセンサを用いて正確でかつ精密な測定と確認を行う。したがって、本発明は、生体内カテーテル法用の直径を最小にしたセンサを提供して、定性および／または定量の両条件で、最高の正確さと精密さで多数のパラメータを測定することとあいまって、検定のために行う生体の血流または組織への侵入を最小にしつつ生体に与える不快感と痛みを最小にする。

本発明のバイオセンサは、選択される特定の生物学的結合パートナーによって、多種類の分析対象物質を検出するのに利用できる。上記のように、生物学的結合パートナーは、他の分子を特異的に認識し結合して、結合複合体を形成する分子である。代表的な結合複合体としては、限定されないが、抗体－抗原、レクチナー炭水化物、核酸－核酸、ビオチン－アビシン、受容体－受容体リガンドなどがある。この結合複合体のどちらかのメンバーが、バイオセンサを構成する光ファイバーのセンサ末端11に結合された生物学的結合メンバーとして使用される。したがって、例えば、試料中の抗体を検

出したい場合は、対応する抗原をセンサ末端に結合させる。逆に、試料中の抗原を検出したい場合は、抗体をセンサ末端に結合させる。

特定の検定法に用いる結合パートナーの選択法は当該技術分野の当業者にとって公知である。一般に、タンパク質を検出するには、抗体が生物学的結合パートナーとして最も好ましい。酵素の基質を検出するには、酵素が好ましい生物学的結合パートナーであり、そして、核酸を検出するには、核酸の結合パートナーが最も好ましい。したがって、例えば、ヒポキサンチンおよびキサンチンを検出するために、キサンチンオキシダーゼおよびペルオキシダーゼのような酵素を利用する光ファイバーバイオセンサ (Hlavayら、Biosensors and Bioelectronics, 9 (3)巻189～195頁1994年)；有機リンベースの殺虫剤を検出するためにアルカリホスファターゼを利用する光ファイバーバイオセンサ (Gaoら、Proceedings -- Lasers and Electro-Optics Society, Annual Meeting, 8 (4) : アブストラクト 20782、1994年)；ならびに抗体またはDNAの結合タンパク質を用いる光ファイ

バーバイオセンサ (Andersonら、Fiber Optic Medical and Fluorescent Sensors and Applications, Proc. S.P.I.E., 1648巻39~43頁1992年) が報告されている。

勿論、本発明のバイオセンサは、いくつもの異なるクラスの分析対象物質を同時に検出するよう設計することができる。したがって、本発明のバイオセンサは、二つ以上の異なるクラスの生物学的結合パートナーを組み合わせてもっている。センサ面13は、例えば、核酸、タンパク質、抗体、炭水化物、ビオチン、アビジンおよびレクチンからなる群から選択される一つ以上の結合パートナーをもっている。

最も簡単な用途で、本発明のバイオセンサは、試験試料中の单一

分析対象物質を検出するのに使用できる。その試験試料は、生体内、培養中または生体外の試料でもよい。本発明の検定法は、分析対象物質の単なる存在の有無を指示するかまたは試料中に存在する分析対象物質の量を定量することができる。

本発明の検定法は、直接方式または競合方式で実施することができる。直接方式では、分析対象物質の量が、生物学的結合パートナーに結合した分析対象物質を直接測定することによって確認される。競合方式の場合、既知量の分析対象物質を試料中に入れ、被検分析対象物質を、センサ面13に存在する生物学的結合パートナーに対して、前記既知量の分析対象物質と競合する性能によって検定する。

好ましい使用法で、光ファイバーアレイ14を構成する光ファイバー10は、センサ面11の生物学的結合パートナーと試料中の分析対象物質との結合を示す光信号を伝導する。その光信号は、当該技術分野の当業者にとって公知のいくつもの方法で発生させることができる。一般に、その光信号は、光ファイバー10のセンサ末端11に存在する蛍光、発光または着色の標識で発生する。一般に、光ファイバーのセンサ末端における標識の濃度は、センサ末端に存在する生物学的結合パートナーに特異的に結合する分析対象物質の濃度の関数である。

その濃度が生物学的結合パートナーと特異的に結合する分析対象物質の量の関

数である標識を付加する方法は当該技術分野の当業者にとって公知である。最も簡単な方法の場合、分析対象物質自体を標識化する。分析対象物質が結合パートナーに結合すると、その標識は結合パートナーが結合しているセンサ末端11に移動するあるいは、標識化された“ブロッキング”分析対象物質を試験試料に添加するかまたはバイオセンサに予め結合させてもよい。試料中の未標

識化被検分析対象物質による、標識化“ブロッキング”分析対象物質の置換によって、センサ末端に結合した標識が減少して、その減少量が試験試料中の未標識化分析対象物質の濃度に比例する。

他の方法は、それ自体が標識化されている第二の生物学的結合パートナーを用いる。センサ末端に結合された第一生物学的結合パートナーが、分析対象物質に結合してこれを同定化する。次に、第二の標識化結合パートナーを、センサに固定化された上記分析対象物質に結合させて、その標識を、それが検出されるセンサ末端に移動させる。

標識が発する光を測定して、発光標識を検出し、光ファイバーを通じて伝導させる。発光標識は一般に外部照明を全く必要としない。

対照的に、比色法標識または蛍光標識は一般に、光源が必要である。比色法標識は一般に、溶液の吸光度を増大させおよび／または溶液の吸収スペクトルを変化させる。比色法標識は、吸収スペクトルの変化または固定光源が発する光の全吸光度の変化を比較することによって測定される。本発明では、吸光度または吸収スペクトルの変化は、バイオセンサを構成する光ファイバーによって検出することが好ましい。吸光度または吸収スペクトルの変化は、完全に校正された光源からの照明の変化として測定されるか、あるいは第二の“参照光源”に対して測定される。その第二光源は、バイオセンサの外側にあるかまたは一体要素として設置してもよい。一つの実施態様で、構成要素の光ファイバーのいくつかは、信号および／または参照光源からの光をセンサ面に伝導する。感度を最高にするため、吸光度および吸収スペクトルの変化を測定するのに使用される光は、バイオセンサのセンサ面に直接、送られる。

蛍光標識は、光源による励起に対し応答して光を発する。励起光

となる波長の小さいことを特徴とする発光が、蛍光標識が結合した光ファイバーを通じて検出される。

励起光は、当該技術分野の当業者にとって公知のいくつもの方法にしたがって、バイオセンサの一体要素または別個の光源によって与えられる。エバネッセント波システムが、光ファイバーの伝送末端12に光ビームを導入する。この光ビームは、ファイバーのセンサ末端11に到達するまでファイバーによって伝導され、試験溶液中に、エバネッセント波成分として知られている電磁波を生成する。このエバネッセント波成分は、発蛍光団を励起して蛍光信号を生成するのに十分なものである（例えば、米国特許第4,447,546号および同第4,909,990号参照。なおこれらの文献は本明細書に援用するものである）。

他の実施態様で、励起光はバイオセンサに外側から与えられる。励起光は、光ファイバーのセンサ末端11に対して直角の“透照光”として与えることが特に好ましい（例えば図4参照）。この配置構成では、大部分の励起光が光ファイバーによって伝導されないので、この場合、S/N比が増大する。バイオセンサを構成する個々の光ファイバー10は、例えば図6Aと6Bに示すように階段式にして、個々のファイバーが透照光を照射されたときに、互いに透照光を遮ることがないようにすることができる。

与えられた検定フォーマットを最適化するため、当業者は、光ファイバー、センサ面の配置形態、発蛍光団、励起バンドと発光バンドなどの異なる組合せの場合の蛍光検出の感度を決定することができる。各種の光ファイバーアレイの配置構成によって分析対象物質を検出する場合の感度は、例えば、バイオセンサを用いて、蛍光で標識化した分析対象物質の希釈シリーズを測定することによって容易に決定することができる。したがって、発蛍光団とバイオセン

サの各種組合せから達成できる感度、直線性およびダイナミックレンジを決定することができる。発蛍光団の対を、既知の相対比率で連続的に希釈したものを作成して、蛍光比の測定値が、検出器およびバイオセンサが容認するダイナミックレンジにわたって実際の発蛍光団の比率を反映する精度を決定することができる。

比較ゲノムハイブリッド形成法での使用

特に好ましい実施態様で、本発明のバイオセンサは、比較ゲノムハイブリッド形成(Comparative Genomic Hybridization)(CGH)検定法に用いられる。比較ゲノムハイブリッド形成法(CGH)は、増幅または欠失したヌクレオチド配列の存在を検出しそして該ヌクレオチドの染色体位置を確認するのに用いる最新の方法である〔Kallioniemiら、Science, 258巻818～821頁1992年；国際特許願公開第WO 93／18186号および同時係属出願の米国特許第08／353,018号（1994年12月9日出願）参照。なおこれらの文献は本明細書に援用するものである〕。

従来、CGHを実施する場合、ゲノムDNAが、正常な対照細胞と試験細胞（例えば腫瘍細胞）から単離される。これら2種の核酸(DNA)を異なる標識で標識化し、次に対照細胞の中期染色体と系中でハイブリッドを形成させる。上記の対照細胞と試験細胞のDNAの両者のなかの反復配列を除くかまたはそれらのハイブリッド形成容量を未標識化ブロッキング核酸（例えばCot-1）などの何らかの方法で低下させることができる。コピー数が増大または減少している試験細胞の染色体領域は、前記2種のDNAからの信号の比率が変化している領域を検出することによって、迅速に確認することができる。例えば、試験細胞中、コピー数が減少したこれらの領域は、ゲノムの他の領域に比べて、対照のDNAより試験DNAの方が比較的低い信号を示す。試験細胞中、コピー数が増大した領域は、試験DNAより比較的高い信号を示す。

一実施態様で、本発明は、従来のCGHでハイブリッド形成標的として用いていた中期染色体の代わりに、本発明のバイオセンサを用いるCGH検定法を提供するものである。しかし、本発明のバイオセンサに存在する生物学的結合パートナーは、ゲノムの異なる領域から選択された核酸配列である。そのバイオセンサ自体は一種の“ガラスの染色体(glass chromosome)”になり、核酸と特定の結合パートナーのハイブリッド形成は、その核酸と、上記生物学的結合パートナーが誘導される中期染色体の領域とのハイブリッド形成と、情報としては等しい。さらに、ゲノム中に通常、含まれていない核酸の結合パートナー、例えばウイルスの核酸を利用できる。

さらに詳しくは、CGH検定法において、本発明のバイオセンサは、図5に示すように、第一コレクションの核酸分子の少なくとも二つの核酸配列のコピー数を、第二コレクションの同じ配列のコピー数と定量的に比較する方法に利用できる。この方法は、第一コレクション25の核酸分子と第二コレクション26の核酸分子それを、第一と第二の標識で標識化して、少なくとも二つのコレクションの核酸プローブを形成させることからなる方法である。その第一と第二の標識は、互いに識別できなければならない。

用語“プローブ”は、本発明で使用する場合、1種以上の化学結合によって、通常は水素結合の生成によって、相補的配列の標的核酸に結合できる核酸分子(RNAまたはDNA)のコレクションと定義する。これらのプローブは、下記のようにして直接または間接的に標識化することが好ましい。これらプローブは、一般に複雑度が高く、例えば細胞または細胞集団から単離した全ゲノムのDNAまたはmRNAで調製される。

このようにして製造されたプローブ30は、核酸が標的核酸とハイブリッドを形成できる条件下で、アレイ14のバイオセンサのセンサ面13上に存在する複数の標的核酸に同時にまたは順に接触させる。この場合、透過照明光源19を利用する。これらプローブを標的核酸に接触させた後、各プローブの結合量およびプローブの結合比を、標的核酸の種の各々について測定する。一般に、標的核酸に対する結合比が大きければ大きいほど、核酸に結合する前記2種のプローブの配列のコピー数比が大きい。したがって、標的核酸配列中の結合された標識の比を比較することによって、これらプローブの異なる配列のコピー数比を比較できる。

好ましい実施態様で、本発明のバイオセンサにおける各標的核酸の配列複雑度は、標識化された核酸の第一と第二のコレクションの配列複雑度よりはるかに低い。用語“複雑度”は本明細書では、Brittenら、Methods of Enzymol., 29巻363頁1974年に述べられているようなこの用語の標準の意味にしたがって用いられる（また、核酸の複雑度のさらに詳しい説明については、“Cantor and Schimmel Biophysical Chemistry” :PartIII, 1228~1230頁参照）。

これら の方法は、一般に、系内でのハイブリッド形成の蛍光に適した方法を用いて行われる。したがって、第一と第二の標識は通常、蛍光の標識である。

プローブ中の反復配列が標的核酸とハイブリッドを形成するのを阻止するため、標識を付けていないプロッキング核酸(例えばcot-1 DNA)をプローブと混合してもよい。したがって、本発明はゲノム中の非反復配列の分析に集中する。しかし、バイオセンサの標的として反復配列を用いてプロッキング核酸を削除すると、反復配列に対する相対コピー数を測定することができる。

典型的な実施態様で、第一コレクションのプローブ核酸は、試験細胞、試験細胞集団または試験中の組織から調製され、そして第二

コレクションのプローブ核酸は、対照細胞、対照細胞集団または対照組織から調製される。対照細胞は、正常な非疾患細胞でもよく、または、疾患の他の態様の標準として役立つ疾患組織の試料由来の細胞でもよい。例えば、対照プローブが正常な細胞から単離されたゲノムDNAであれば、そのプローブの各配列の、他のものに対するコピー数は公知である(例えば各常染色体配列の2コピーおよび各性染色体配列の1コピーまたは2コピーは性別によって決まる)。これを試験プローブと比較すると、正常なものから変種を検出することができる。あるいは、対照プローブは、その異なる配列間でコピー数がかなり変化している原発腫瘍由来のゲノムDNAから調製することができ、そして試験プローブはその腫瘍由来の転移細胞のゲノムDNAから調製することができ、これらを比較すると、原発腫瘍とその転移状態の差が分かる。さらに、両プローブは正常細胞から調製できる。例えば、異なる組織の正常細胞間のmRNA集団を比較すると、組織の分化の重要な特徴である特異な遺伝子発現を検出することができる。したがって、一般に、試験および対照という用語は、便宜上、これら2種のプローブを区別するのに使用されるが、これらプローブに含まれている核酸の他の特性を含んでいない。

標的核酸

光ファイバー10のセンサ末端11およびプローブに結合される生物学的結合パートナーを構成する標的核酸類としては、例えばRNA、DNAまたはcDNAがある。これら核酸類はいずれの生物由来のものでもよい。これら核酸類は、染色体の特定領

域に対応するゲノム配列でもよく、または発現される配列、例えばcDNAまたはmRNAでもよい。標的配列およびプローブ中の核酸は通常、同じ種由来の核酸である

生物学的結合パートナーを構成する“標的核酸”は、一般に、ゲ

ノムの特定領域にその起源をもっている（例えばゲノムライブラリー由来の単一クローンまたはいくつもの連続したクローン）か、または機能遺伝子単位に対応し、そして完全な場合も完全でない場合もある（例えば完全cDNAまたは部分cDNA）。また標的核酸はinter-Aluまたはかのようなクローンから誘導される縮重オリゴヌクレオチドプライマーPCR生成物を含有していてもよい。遺伝子発現を分析する場合、標的要素は完全cDNAまたは部分cDNAを含有していてもよい。

標的核酸は、例えば、特定の遺伝子を含有しているか、または、対象の細胞、例えば腫瘍細胞中、増減したコピー数で存在していると予想される染色体領域由来の核酸でもよい。また、標的核酸は、mRNAであるか、または異常なレベルで転写されると予想される前記mRNAから誘導されるcDNAでもよい。

あるいは、標的核酸は、未知の有意性または位置の核酸を含有していてもよい。本発明のバイオセンサのセンサ面13を構成するかのような標的核酸のアレイは、制限はないが、全ゲノム、単一の染色体または染色体の一部を含むゲノムの所望の部分を、連続的にまたは離れた点でサンプリングする位置から誘導される核酸でもよい。標的要素の数と、各標的要素中の核酸の複雑度によって、サンプリングの密度が決定される。例えば、300種類の種の標的核酸（生物学的結合パートナー）を有するバイオセンサは、各標的核酸が異なるゲノムクローン由来のDNAであるが、10メガ塩基の間隔で全ヒトゲノムをサンプリングできる。各々100kbのゲノムDNAを含有する30,000要素のアレイは、ヒトゲノムを完全にカバーできる。

同様に、未知のcDNAクローン由来の核酸を含有する標的核酸のアレイは、対象のいくつかの細胞で分化して発現される核酸を確認することができるので、これらの遺伝子の研究に注意を集中できる。

いくつかの実施態様で、対象の特定の染色体領域にもとづいて予め位置決めされたクローンが標的として使用される。このようなクローンは、ゲノムの世界中におよぶイニシャチブが急速に進んだ結果、入手可能になりつつある。

位置決めされたクローンは、単染色体、複合染色体または染色体のセグメントから構築したライブラリーから調製することができる。標準の方法を使用して、コスミド類、酵母の人工染色体類(YAC)、細菌の人工染色体類(BAC)、およびP1ファージなどのベクター中で、適切な大きさにしたフラグメントをクローン化する。

上記のように、クローンライブラリーを生成させることができるが、全染色体にわたるライブラリーも市販されている。例えば、ヒトおよび他のゲノム由来の染色体特異的ライブラリーは、Clonetech社(米国カリフォルニア州、サウスサンフランシスコ所在)またはThe American Type Culture Collectionから入手することができる(“ATCC/NIH Repository of Catalogue of Human and Mouse DNA Probes and Libraries第7版、1993年参照)。

必要に応じて、上記クローン類は、遺伝学的にまたは物理的に位置決めすることができます。例えば、FLSHとディジタル画像分析法を用いて、特定のコスミド挿入体がハイブリッドを形成する染色体上の位置を確認して位置決めを行うことができる。この方法は、例えば、Lichterら、Science, 247巻64~69頁1990年に記載されている。物理的に位置決めされたクローンを用いて、最終的に、CGHまたは他の方法を用いて確認された対象の領域を位置決めすることができる。

当業者は、長さと配列が異なるいくつもの核酸が一つの染色体の特定の領域にあるように、各標的核酸を選択できることが分かるであろう。したがって、例えば、バイオセンサのセンサ面13は、DNA

のクローン化ピースを2コピー以上もつことができ、そして各コピーは異なる長さのフラグメントに切断することができる。当業者は、標的配列の長さと複雑度を調節して、最適のハイブリッド形成と所定のハイブリッド形成の進行に関する信号発信を行い、そして異なる遺伝子またはゲノムの位置間の必要な分割を行うことができる。一般に、標的配列の複雑度は約1kb~約1Mbである。

プローブ核酸の製造

標的核酸（光ファイバーに結合されている核酸）と同様に、広範囲の核酸を、本発明の方法のプローブ核酸として使用することができる。これらのプローブは、例えば、特定の生物、組織または細胞型由来の全ゲノムであるゲノムDNAを含有していてもよく、または、単染色体などのゲノムの一部を含有していてもよい。

特定の单一の遺伝子または複数の遺伝子の発現レベルを比較するため、プローブの核酸は、生物、組織または対象の細胞から調製したmRNAまたはcDNAから誘導してもよい。例えば、試験cDNAまたは試験mRNAは、正常な対照細胞由来のmRNAまたはcDNAとともに、基準化cDNAライブラリー由来のクローンを含有する、センサの標的核酸のアレイとハイブリッドを形成することができる。さらに、二つの細胞集団由来のゲノムDNAで製造したプローブは、標的cDNAアレイとハイブリッドを形成して、ゲノム中の変異DNAコピー数の領域由来のcDNAを検出することができる。

本発明の方法は、核酸の二つ以上の集団を組み合わせた特定の配列のコピー数を比較するのに適している。当業者は、比較される試料の核酸の特定の集団が本発明にとって重要でないことが分かるであろう。例えば、二つの類縁種由来のゲノムまたはcDNAは比較することができる。あるいは、2種以上組織または細胞型中の特定の遺伝子の発現レベルは比較できる。上記のように、これらの方法は、

疾患を診断するのに特に有用である。

標準の方法を使用して、適当な組織から核酸類(DNAまたはmRNA)を単離することができる〔例えば、Sambrookら、Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratoy (米国ニューヨーク州コールドスプリングハーバー所在) 1985年参照〕。cDNAをmRNAから製造する従来の方法も使用できる。

核酸類が単離される特定の細胞または組織は、特定の用途によって決まる。一般に、癌に関連する異常を検出する場合、ゲノムDNAは腫瘍細胞から単離される。疾患を出生前に検出する場合は、胎児細胞を使用する。

組織の試料が小さくて、少量の核酸しか入手できない場合、縮重プライマーを

使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの増幅法を使用できる(PCRについての一般的な説明については、Innisら編“PCR Protocols”，Academic Press社1990年参照)。さらに、PCRを用いて、高いコピーの反復配列間の配列を選択して増幅することができる。これらの方法は、分散している高度に反復する配列(例えばAlu)に相補的なプライマーを用いて、Aluファミリーの二つのメンバー間にある配列を選択的に増幅する(Nelsonら、Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 86巻6686頁1989年参照)。

細胞遺伝学のレベルのCGHによれば、例えば正常なゲノムと腫瘍のゲノム間のコピー数に差がある領域を確認することによって、疾患遺伝子の探究が容易になる。例えばCGH試験は、乳癌のコピー数の変動の分析に利用されている(例えばKallioniemiら、Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 91巻2156～2160頁1994年参照)。

CGHで、コピー数の変化を位置決めできる分解能は、数メガ塩基のオーダーである。本発明の場合、分解能は、標的核酸配列を含有するゲノムDNAセグメントの長さおよび近傍クローン間の地図位置

の差の関数である。本発明によって、標準のCGHより10倍以上も優れた分解能を達成することができる。この改良された位置測定法によって、疾患に関連する重大な遺伝子の確認が容易になり、マイクロデリーション(microdeletion)症候群などのゲノムの小領域に関する異常を一層優れた感度で検出することができる。

核酸プローブの標識化

標的核酸とハイブリッドを形成する核酸は、上記のように、ハイブリッド形成複合体を検出できるように標識化することが好ましい。以下に述べるハイブリッド形成反応で使用される核酸プローブは、ハイブリッド反応を行う前に、標識化して検出できるようにすることができる。あるいは、ハイブリッド形成反応の生成物に結合する検出可能な標識を選択してもよい。上記のように、標的核酸アレイは、二つ以上のプローブ核酸と、同時にまたは連続してハイブリッドを形成する。したがって、これらプローブは、各々、別個の識別可能な標識で標識化することが好ましい。

プローブの核酸に結合される特定の標識すなわち検出可能な基は、プローブと

標的配列のハイブリッド形成反応を著しく妨害しないように選択される。検出可能な基は、検出可能な物理特性または化学特性を有する物質であればよい。このような検出可能な標識は、核酸ハイブリッド形成反応の技術分野で盛んに開発されており、一般に、この方法で有用な標識は大部分、本発明に利用できる。したがって標識は、分光学的、写真化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的な手段で検出可能な組成である。

しかし、好ましい標識は光信号を発する。したがって、本発明で特に有用な標識としては、蛍光染料類（例えば、フルオロセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミンなど）および各種の酵素類（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスフ

アターゼおよびELISA法で通常使用される他の酵素類）のように比色信号を発する標識がある。

核酸はリガンドを使用して間接的に標識化することができ、そのリガンドに対する検出可能な抗リガンドを利用できる。例えば、ビオチニル化された核酸類は、当該技術分野で公知の方法にしたがって、標識化されたアビジンまたはストレプタビジンを用いて検出することができる。さらに、抗原分子またはハプテン分子は、標識をつけた抗血清またはモノクローナル抗体を用いて検出できる。例えば、N-アセトキシ-N-2-アセチルアミノフルオレンまたはジゴキシゲニンで標識化したプローブは、これらの化合物と特異的に免疫反応性の抗体を用いて検出できる〔例えば、FITCで標識化したヒツジ抗ジゴキシゲニン抗体(Boehringer Mannheim社)〕。さらに、チミジン-チミジン二量体に対する抗体で標識化したものも使用できる(Nakaneら、ACTA Histochem.Cytochem., 20巻229頁1987年)。

一般に、できるだけ小さいコピー数で検出可能であり、そのため検定法の感度を最大にすることができる、しかもバックグラウンド信号を超えて検出できる標識が好ましい。局部的信号を提供し、その結果、各標的要素からの信号の空間分解能を提供する標識を選択することが好ましい。

これらの標識は、当該技術分野の当業者に公知の各種の手段でDNAに結合させ

ることができる。好ましい実施態様で、プローブはニックトランスレーション法またはランダムプライマー伸長法を用いて標識化される [Rigbyら、J.Mol.Biol., 113巻237頁1977年またはSambrookら、“Molecular Cloning-A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory(米国ニューヨーク州コールドスプリングハーバー所在)1985年]。

標識化核酸と標的のハイブリッド形成

二つのプローブを一つ以上の標的核酸アレイ(バイオセンサ)とハイブリッドを形成させることによって、これらプローブ中の特定の核酸配列のコピー数を比較する。各標的要素上のプローブによって生成する、ハイブリッド形成信号の強さおよび強さの比を測定する。一般に、標的核酸の信号の強さの比が大きければ大きいほど、その標的配列に結合する、二つのプローブ中の配列のコピー数比が大きい。したがって、標的要素間の信号の強さの比を比較することによって、これらプローブ中の異なる配列のコピー数比を比較することができる。

標準のハイブリッド形成法を用いて、標的核酸アレイをプローブする。適切な方法が、CGH法を説明する諸文献に記載されている(Kallioniemiら、Science, 258巻818～821頁1992年および国際特許願公開第WO 93/18186号)。一般的な方法に対するいくつもの指針を入手することができる。例えば、Tijssen著“Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I and II”(アムステルダム所在のELSevier社、1993年)がある[系内ハイブリッド形成に適切な方法に関する説明については、Gallら、Meth.Enzymol., 21巻470～480頁1981年、およびSetlowとHollaender編“Genetic Engineering:Principles and Methods”7巻43～65頁のAngererらの報告(米国ニューヨーク所在のPlenum Press社、1985年)参照]。

一般に、本発明のバイオセンサを利用する核酸のハイブリッド形成法は下記の主要ステップで構成されている。すなわち(1)標的DNAの接近性(accessibility)を増大しつつ非特異的結合を減らすためのハイブリッド形成前の処理；(2)核酸混合物と、バイオセンサ上の核酸標的のハイブリッド形成；(3)上記ハイブリッド形成反応で結合しなかった核酸フラグメントを除く、ハイブリッド形

成後の洗浄、および(4)ハイブリッドを形成した核酸フラグメントの検出のステップである。これら各ステップで用いる試薬と、使用されるこれらステップの条件は、その特定の用途によって決まる。

用途によっては、反復配列のハイブリッド形成容量をブロックする必要がある。反復配列のハイブリッド形成容量を除きおよび／または無効にする方法はいくつも知られている(例えば、国際特許公開第W0 93/18186号参照)。

例えばバルク法(bulk procedure)を使用できる。ヒトのゲノムをはじめとして多くのゲノムにおいて、共有されている反復DNAの主要部分が、Aluなどの高度に反復される配列の少数のファミリー内に含有されている。これらの方法は、相補的配列のハイブリッド形成速度が、その濃度が増大するにつれて増大することを利用する。したがって、反復配列は、一般に高濃度で存在しているが、ハイブリッド形成条件下で変性およびインキュベーションを行うと、他の配列より迅速に二本鎖になる。この二本鎖核酸を除いて、残りをハイブリッド形成に使用する。一本鎖の配列を、二本鎖の配列から分離する方法としては、ヒドロキシアバタイト、または固体支持体に結合させた固定化相補的核酸を使用する方法がある。あるいは、部分的にハイブリッドを形成した混合物を使用することができ、そして二本鎖配列は標的とハイブリッドを形成することができない。

あるいは、ハイブリッド形成容量を抑制したい配列に相補的な未標識化配列を、ハイブリッド形成混合物に添加してもよい。この方法は、反復配列および他の配列のハイブリッド形成を抑制するのに使用できる。例えば、“Cot-1”DNAは、試料中の反復配列のハイブリッド形成を選択的に抑制するのに使用できる。Cot-1 DNAを調製するには、DNAを抽出し、剪断し、変性し次に復元してCot~1に

する(再結合の動力学およびCot値の説明については、Tijssenの前掲文献の48~54頁参照)。反復頻度の高い反復配列は一層迅速にリアニールするので、生成するハイブリッドはこれらの配列に非常に豊富に含有されている。残っている一本鎖配列(すなわち単コピー配列)をS1ヌクレアーゼで消化し、次いで二本鎖のCot-1 DNAを精製して使用し、試料中の反復配列のハイブリッド形成をブロックする。Cot-1 DNAは上記のようにして製造できるが、市場で入手することもでき

る(BRL社)。再結合してCot値が大きくなると、低コピー数で存在している反復配列を含有するDNAをブロックすることになる。

ハイブリッド形成反応からの検出可能な信号の分析

標識化プローブが発する信号を検出し分析する標準方法を使用することができる。特に、標識化プローブを特定の結合パートナーに結合させることによって発せられる光信号は、その結合パートナーが結合されている光ファイバー10にそって搬送される。上記のように、その光信号は、直接、視覚化されるか、または検出器20によってアナログまたはデジタルの電子信号に変換することができる。試験結果のディスプレイを容易にし、かつ蛍光の強さの小さな差の検出感度を改善するため、検出器とデジタル信号分析システムを用いることが好ましい。その検出器は、一つ以上のフィルターを備え、発光波長を透過し、励起光をフィルターして除きS/N比を増大させる。これらフィルターを使用すると、2種以上の異なる標識を付けたプローブが関連する結合事象の識別が容易になる。このような検出器/フィルター/信号処理システムは当該技術分野で公知である。

【図1】

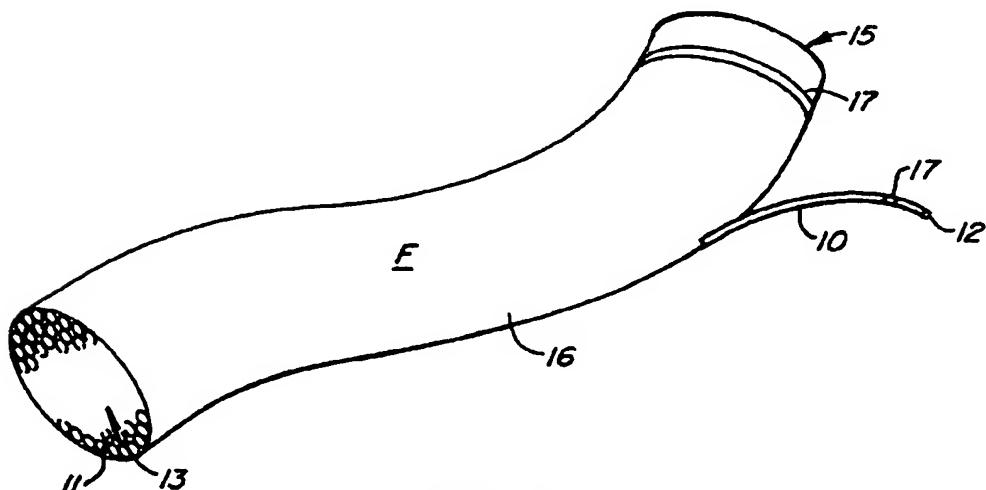


FIG. 1

【図2】

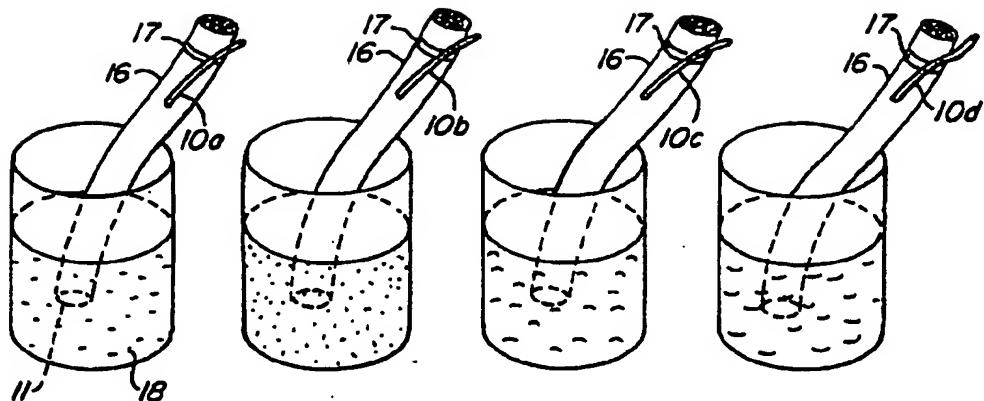


FIG. 2.

【図3】

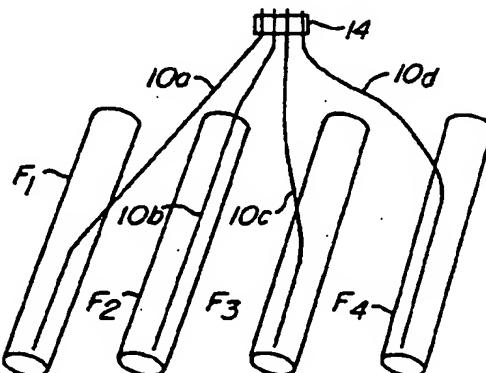
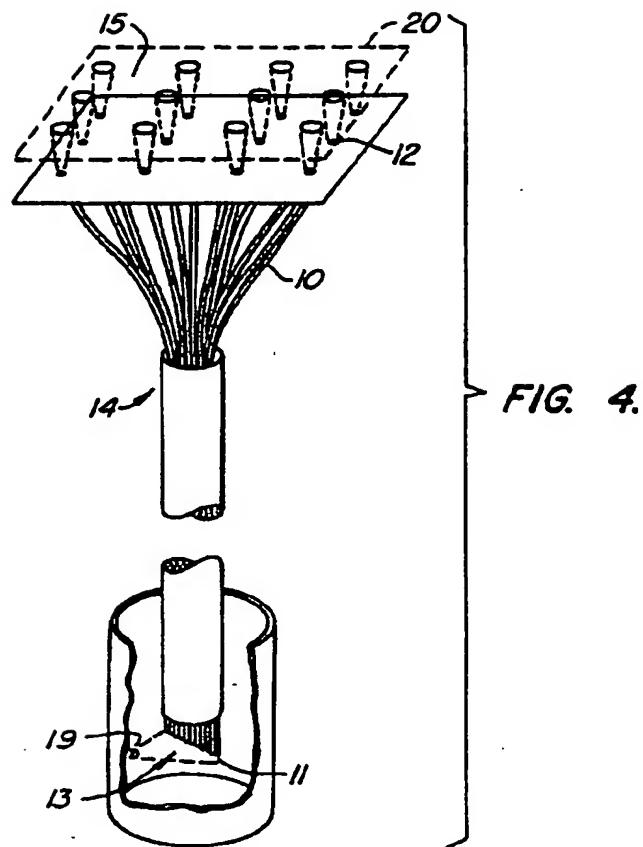


FIG. 3.

【図4】



【図5】

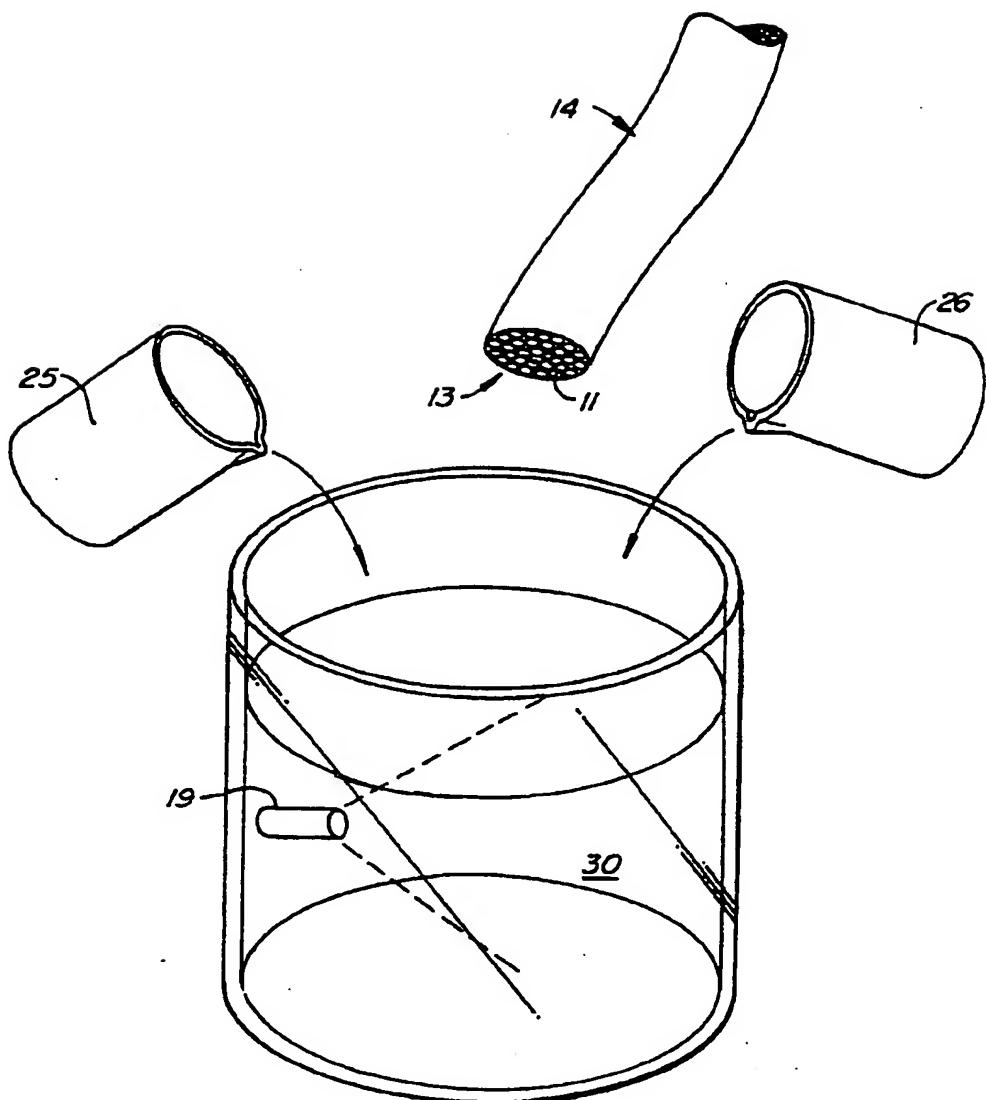


FIG. 5.

【図6】

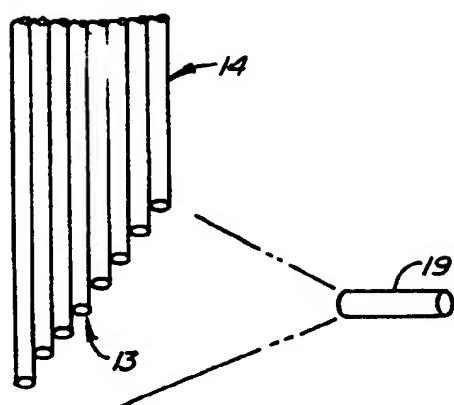


FIG. 6A.

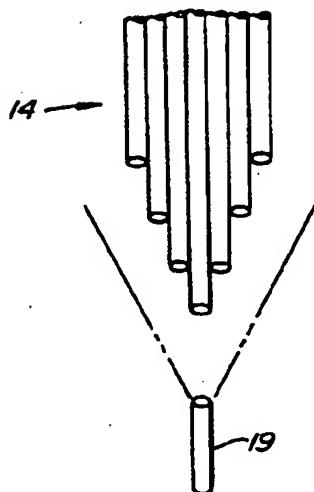


FIG. 6B.

【図7】

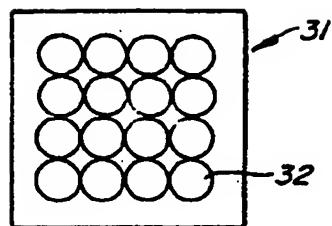


FIG. 7A.

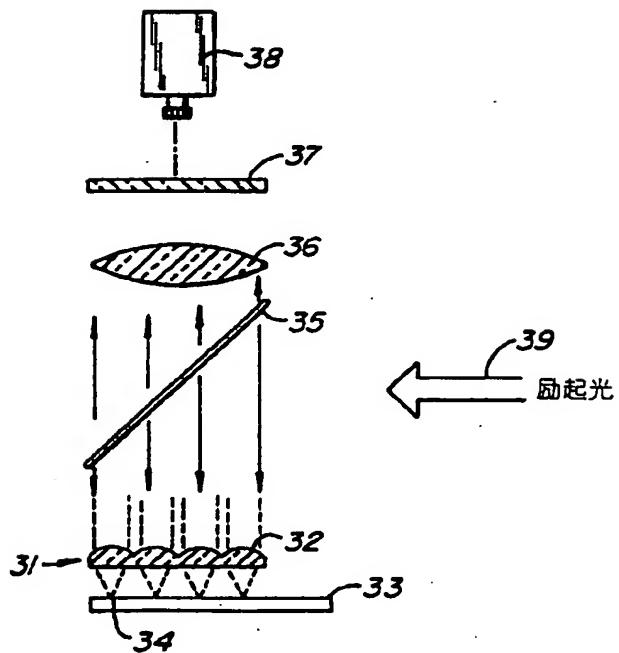
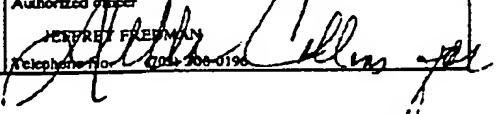


FIG. 7B.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US97/01052
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/S, 6, 91.1, 91.2; 65/409; 423/82.05, 82.06, 82.07, 82.08, 82.09; 436/172; 250/227.23		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,244,636 A (WALT et al) 14 September 1993, see entire document.	1, 2, 5, 8 ---
Y	US H1398 A (CAMPBELL) 03 January 1995, see entire document.	3, 4, 6, 7, 9-20
A	US 5,304,492 A (KLINKHAMMER) 18 April 1994, see entire document.	1-20
Y	US 5,082,630 A (PARTIN et al) 21 January 1992, see entire document.	1-20
Y	US 5,166,990 A (RICCITELLI et al) 24 November 1992	14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' documents dealing with the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'B' earlier documents published on or after the international filing date 'C' documents which may throw doubt on priority (objection) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) 'D' documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other event 'E' documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 MARCH 1997	Date of mailing of the international search report 13 MAY 1997	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer  JEFFREY FREEMAN Telephone No. (703) 305-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US97/01052

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,449,625 A (KOBAYASHI et al) 12 September 1995, see entire document.	1-20
A	US 5,260,029 (HOSOI et al) 09 November 1993, see entire document.	1-20
Y	GRAHAM et al. Gene probe assays on a fibre-optic evanescent wave biosensor. Biosensors & Bioelectronics. 1992. Vol. 7. pages 487-493, see entire document.	1-20
Y	BARNARD et al. A fibre-optic chemical sensor with discrete sensing sites. Nature. 26 September 1991. Vol. 353. pages 338-340, see entire document.	1-20
Y	LIPSON et al. Multifiber, multiwavelength, fiber optic fluorescence spectrophotometer. IEEE Trans. Biomed. Engineer. 09 September 1992. Vol. 39. No. 9. pages 886-892, see entire document.	1-20
Y	MCCURLEY et al. An optical biosensor using a fluorescent swelling sensing element. Biosensors & Bioelectronics. 1994. Vol. 9. pages 527-533, see entire document.	1-20
Y	BLUM et al. Luminescence fiber optic biosensor. Anal. Lett. 1988. Vol. 21. No. 5. pages 717-726, see entire document.	1-20
Y	PIUNNO et al. Fiber-optic based DNA sensor for fluorometric nucleic acid determination. August 1995. Anal. Chem. Vol. 67. No. 15. pages 2635-2643, see entire document.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US97/01032

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (6):

C12Q 1/68, 1/70; C12P 19/34; C03B 37/15; G01N 21/01, 21/29, 27/00, 27/30, 21/27, 21/31, 21/76, 21/25

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

435/5, 6, 91.1, 91.2; 65/409; 422/82.05, 82.06, 82.07, 82.08, 82.09; 436/172; 250/227.23

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS USPAT, MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, WPIDS
search terms: biosensor, sensor, fiber, optic, address, DNA, RNA, nucleic, oligonucleotide,
polynucleotide, photolithography, bundle, matrix, support, surface, polymer, nitrocellulose,
tiered

フロントページの続き

(72)発明者 セグレーブズ, リチャード
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94536,
フレモント, パークモント ドライブ
38061

(72)発明者 ザイ, イエ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94301,
パロ アルト, ウエイブリー ストリート
#エ一 628

(72)発明者 アルバートソン, ドナ ジー。
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94549,
ラファイエット, パート レーン 3302